



Laktik Asit Bakterilerinde CRISPR/Cas Sisteminin Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliğinde Kullanımı

Özge Kahraman Ilıkkan  

Başkent Üniversitesi, Kahramankazan Meslek Yüksek Okulu, Gıda İşleme Bölümü, Gıda Kalite Kontrol ve Analizi Programı, Ankara

Geliş Tarihi (Received): 30.01.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 10.08.2020

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): mikro_ozge@yahoo.com (Ö. Kahraman Ilıkkan)

☎ 0 312 8141919/149 📠 0 312 814 37 37

ÖZ

Laktik asit bakterileri (LAB) düşük GC içeriğine sahip, Gram pozitif, spor oluşturmeyen, hareketsiz, fakültatif anaerob, asidik ortama dayanıklı ve çeşitli besinleri fermente etme yeteneğindeki bakterilerden oluşan bir gruptur. Bu grup genellikle probiyotik ve starter kültür olarak kullanılan bakterileri içerir. “Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR)” ve “CRISPR ilişkili Cas proteinleri”den oluşan CRISPR/Cas sisteminin keşfi ile bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmış ve genom düzenlemeleri kolayca yapılmaya başlanmıştır. Söz konusu sistem yardımıyla yapılan genom düzenlemeleri ve sistemin diğer genetik mühendisliği yöntemleriyle birleştirilmesi, LAB’ın ve probiyotiklerin endüstri ve klinikte kullanımına yönelik yeni bir çığır açacaktır. Bu derleme, CRISPR/Cas sisteminin genel işleyişi, LAB’ta hangi sistemlerden oluştuğu, biyoteknoloji ve genetik mühendisliğindeki mevcut uygulamaları ile gelecekteki potansiyel uygulamaları konusunda geniş bir bakış açısı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, CRISPR/Cas sistemi, Biyoteknoloji, Genetik mühendisliği

Utilization of CRISPR/Cas System of Lactic Acid Bacteria in Biotechnology and Genetic Engineering

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are a group of low-GC content, Gram-positive, facultative anaerob, non-motile, non-spore-forming, acid tolerant bacteria that can ferment various nutrients. This group of bacteria mostly contains starter cultures and probiotics. Discovery of “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)” and “CRISPR-related Cas” proteins accelerated studies pertaining to the subject and provided a simplified genom editing mechanism. Genom editing via CRISPR/Cas system and combination of this system with other genetic tools will break new ground on industrial and clinical applications of lactic acid bacteria and probiotics. This review aims to provide an insight on how CRISPR/Cas system works, which types of CRISPR/Cas system lactic acid bacteria and probiotics contain, how it is applied to biotechnology and genetic engineering as well as the future potential applications.

Keywords: Lactic acid bacteria, CRISPR/Cas system, Biotechnology, Genetic engineering

GİRİŞ

Bakteriler ve arkealar, virüs ve plazmid istilalarına karşı pek çok direnç mekanizması geliştirmişlerdir. Bunlardan

biri olan, düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) ve CRISPR ile ilişkili sistem (Cas) proteinleri (kısaca CRISPR/Cas Sistemi) DNA ya da RNA’yı keserek fajlara ve diğer hareketli genetik

elementlere (MGEs) karşı koruma sağlarlar. Bu sistem, insanda yaşayan kommensal ve patojen bakterilerden, toprak ve gıdalarda bulunan bakterilere kadar farklı ekolojik çevrelerde bulunan mikroorganizmalarda mevcuttur [1]. Bu teknoloji ilk kez 1987'de *E. coli*'de tespit edilmiş, ancak *Streptococcus thermophilus* bakterisinde fajlara karşı oluşturulan adaptif bağışıklık sisteminin temel bileşeni olduğu gösterilerek biraz daha aydınlatılmıştır [2,3]. Bakterilerin kendilerini korumak için geliştirdikleri CRISPR/Cas mekanizması çeşitli araştırmalarda gen ekleme-çıkarma, epigenetik yaklaşımlar, hastalık modelleri gibi genomda kolayca düzenleme yapmayı sağlayacak bir yaklaşım olarak biyoteknoloji çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır [4].

Laktik asit bakterileri (LAB), *Firmicutes* ve *Actinobacteria* filumları içerisinde yer almaktadır [5]. *Firmicutes* filumundaki LAB, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* genuslarını içerirken, *Actinobacteria* filumu ise LAB'tan *Atopobium* ve *Bifidobacterium* genuslarını içermektedir [5–7]. LAB düşük GC içeriğine sahip, Gram-pozitif, spor oluşturmayan, hareketsiz, fakültatif anaerob ve asite dayanıklı, basil ve kok morfolojisindeki bakterilerden oluşan bir gruptur [5,8,9]. Bu bakteriler solunum yolları, gastrointestinal sistem, ağız boşluğu, vajinal boşluk gibi çeşitli habitatlarda, ayrıca süt ürünleri, et ve sebze gibi ortamlarda bulunabilirler [5]. LAB'ın bazı türleri endüstride starter kültür olarak kullanılmakta, bazıları ise probiyotik özellik göstermektedir. Dolayısıyla, bu mikroorganizma grupları süt ürünleri, fermente gıdalar ve gastrointestinal sistem gibi ortamlarda fajlara veya yabancı DNA'ya maruz kalmaları nedeniyle doğal olarak CRISPR/Cas sistemine sahiptirler. *Lactobacillus* cinsinin %62.9'u, *Bifidobacterium* cinsinin %77'si ve *Streptococcus thermophilus* türü %100 oranında CRISPR/Cas sistemini içermektedir [2,10]

Genetik olarak modifiye edilmiş probiyotik ve LAB'ı oluşturmak, probiyotik besinler yoluyla aşı uygulamasına yönelik potansiyellerini arttırmak, endüstride starter kültür özelliklerinin iyileştirilmesi, konağın bağışıklık cevabının düzenlenmesi gibi amaçlarla genetik mühendisliği yöntemleri CRISPR/Cas sistemi ile birleştirilerek çalışmalar yapılmaktadır. CRISPR/Cas sistemi bunların yanı sıra, LAB'ın gastrointestinal sistemden geçişte yaşam şansını arttırmak, konakçıda kolonizasyon, asit ve safra dayanıklılığı ve sindirilemeyen oligosakkaritlerin katabolizması gibi probiyotik özelliklerin güçlendirilmesine yardımcı olabilir [10]. Bu derleme CRISPR/Cas sisteminin genel işleyişi, LAB'ta ve probiyotik bakterilerde şimdiye kadar aydınlatılmış mekanizmaları ayrıca biyoteknoloji, genetik mühendisliği ve endüstrideki potansiyel uygulamaları üzerine bir bakış açısı sunacaktır.

CRISPR/Cas SİSTEMİ

CRISPR/Cas sistemi bakterilerin %45'inde bulunurken, LAB'ın %63'ünde bulunmaktadır. LAB' larda bu sistemin

çok olmasının sebebi, muhtemelen fajlara ve mobil genetik elementlere çok fazla maruz kalmalarıdır [11,12]. Bu sistem sayesinde yabancı DNA'ya ait ufak DNA parçacıkları CRISPR lokusundaki CRISPR tekrarları arasına katılır. CRISPR lokusları genetik pozisyonu, tekrar sekansları ve Cas genlerine göre CRISPR1, CRISPR2, CRISPR3 ve CRISPR4 olarak sınıflandırılırlar [13]. CRISPR/Cas sistemi neredeyse her bakteride değişiklik gösterebilir ancak bir CRISPR lokusu temel olarak şu kısımlardan oluşur (Şekil 1):

Tekrar Dizileri (DR): Bu diziler türler arasında değişiklik gösterebilen ve RNA saç tokası (hairpin loop) yapısının oluşumuna katkıda bulunan dizilerdir. Bu dizilerin arasına aralık (spacer) dizileri girer. 20–38 nt.'lik genellikle palindromik dizilerden oluşurlar ve bir genomda ~600 tekrara kadar bulunabilirler [9, 14, 15] .

Aralık (spacer) DNA Bölgeleri: Bakterileri enfekte eden faj ya da plazmit tarzı istilacıardan kazanılmış bağışıklık oluşturulması amacıyla alınan dizilerdir. Bu diziler PAM sekanslarına bitişik olarak bulunurlar [14, 16].

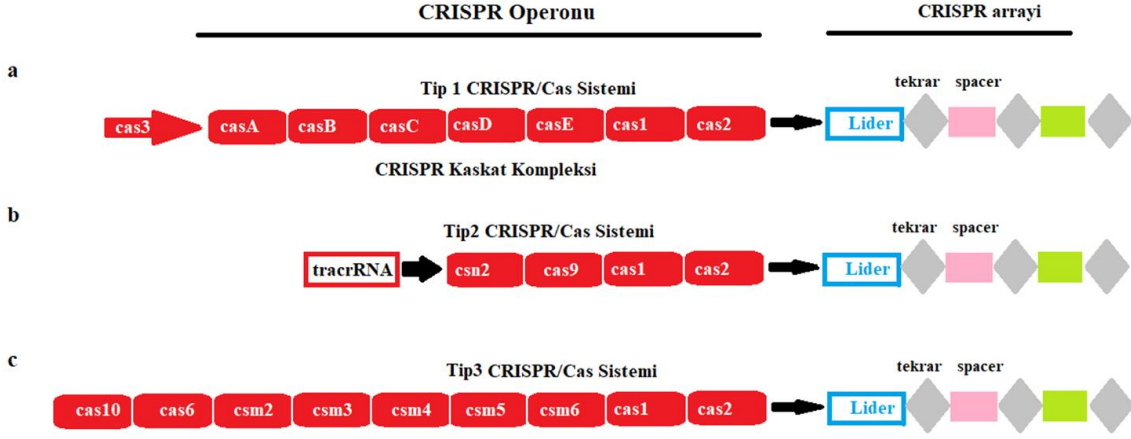
Lider dizisi: Lider dizisi transkripsiyonun başlama noktasıdır. Açık okuma çerçevesi içermez ve korunmamıştır [14, 16].

Cas Genleri: CRISPR dizisine yakın yerde bulunurlar ve Cas proteinlerini kodlarlar. Bu proteinlerin özelliği endonukleaz, ekzonukleaz, helikaz aktivitesi göstermeleridir. Cas proteinleri dört fonksiyonel gruba ayrılmaktadır [17];

- a) Yeni immün markerlarının alımını ve kromozoma entegrasyonu için rekombinaz ve nükleaz aktivitesi gösteren proteinler. Örn; Cas1 ve Cas2
- b) CRISPR RNA'ları işlemek için ribonükleazlar
- c) Kaskat, Cas9, Cmr ve Csm içeren crRNP kompleksine katılan proteinler
- d) Yabancı hareketli mobil genetik elementlerin parçalanması için Cas3, Cas9 gibi nükleazlar

Son sınıflandırmaya göre CRISPR/Cas sistemi, 2 sınıf (Class 1 ve Class 2), 6 Tip (I-VI) ve 33 alt tipten oluşmaktadır [18]. Bu sınıf ayırımı Cas genleri kompozisyonu, gen sinteni ve tekrar dizileri, DNA/RNA parçalanmasından sorumlu crRNA-efektör kompleksine göre yapılmaktadır (Kaskat, Csm veya Cmr) [2, 16, 19]. Sınıf 1 CRISPR-Cas sistemi, çoklu protein efektör kompleksi içerir ve 6-10 arası Cas proteini, büyük bir kaskat ya da Cmr kompleksi ile beraber hareket eder. Sınıf 2 CRISPR-Cas sistemi ise tekil protein efektör kompleksinden oluşur ve Cas9, Cas12 veya Cas 13 gibi proteinleri içerir [16, 20]. Tip 1, 3 ve 4, Sınıf 1 CRISPR-Cas sisteminde yer alırken, Tip 2, 5 ve 6 Sınıf 2 CRISPR-Cas sisteminde yer almaktadır.

CRISPR/Cas sisteminde Tip 1, Tip 2 ve Tip 5' de DNA hedeflenirken, Tip 6' da RNA, Tip 3' de ise hem RNA hem de DNA hedeflenmektedir. Tip 4 ise henüz deneysel olarak aydınlatılmamıştır [21]. Bu kadar çok çeşitli tipte CRISPR/Cas sistemi olmasına rağmen, söz konusu sistem temel olarak şu süreçlerden oluşur [2, 15, 16, 18, 22]:



Şekil 1. Tip 1, Tip 2, Tip 3 CRISPR/Cas lokus ve array sistemi [13]

Adaptasyon:

CRISPR/Cas sisteminde ilk basamak adaptasyondur.

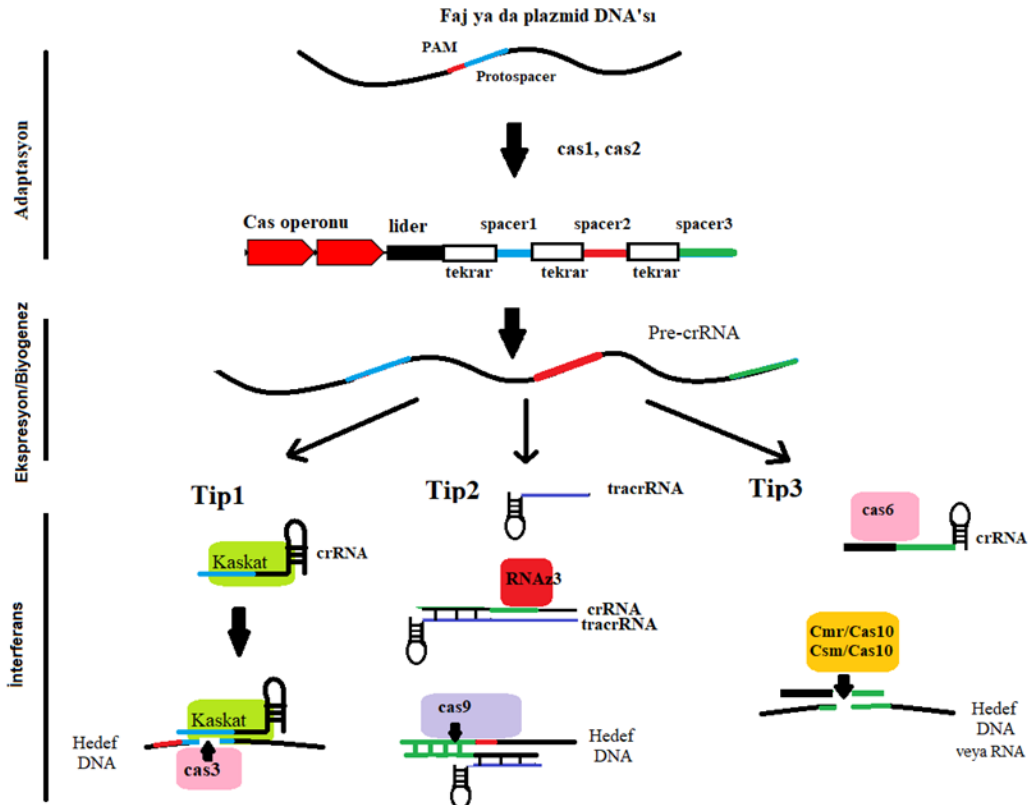
Adaptasyon süreci kabaca iki adımdan oluşur:

- İstilacı DNA'sından protospacer (protoaralık) sekansının seçimi
- Protospacer sekansının CRISPR dizisine katılımı.

Protospacer ifadesi, yabancı DNA'da bulunan ve spacer-repeat-spacer (aralık-tekrar-aralık) dizisine henüz katılmamış hedef DNA'yı ifade eder. Bu dizi spacer-repeat-spacer dizisine katıldığında artık spacer olarak ifade edilir [1, 2]. Yeni spacer sekans alımının sebebi organizmanın otoimmüniteyi engellemek için kendinden olan ve kendinden olmayan DNA'yı ayırt

etmek istemesidir. Adaptasyon sürecine Cas1 ve Cas2 kompleksi aracılık eder [2] (Şekil 2).

Tip 1 ve Tip 2 sisteminde spacer alımı, PAM dizisi ile gerçekleşir. PAM dizisi protospacer'a bitişik 2-4 nükleotidlik bir settir ve hedef DNA'nın tanınmasını sağlar. PAM sekansı türden türe değişiklik gösterebilir ama bazı *Lactobacillus* türlerinde şu şekilde olduğu tahmin edilmektedir; *L. casei*; 5'-tGAAA-3', *L. rhamnosus*; 5'-aGAAA-3', *L. gasseri*; 5'-cTAACc-3', *L. jensenii*; 5'-tGGc-3', *L. pentosus*; 5'-gTTAAT-3' [16]. Tip 3 ise PAM içermeyen bir mekanizma kullanmaktadır. Spacer dizilerinin tekrarlar arasına katılmasında DNA tamir mekanizması rol oynamaktadır [2].



Şekil 2. Tip 1, Tip 2, Tip 3 CRISPR/Cas Sistemi [2]

Ekspresyon/Biyogenez Basamağı:

Ekspresyon basamağı 3 kısımdan oluşur:

- Cas geni ve CRISPR ekspresyonunun düzenlenmesi
- Cas kompleksi oluşumu
- pre-crRNA (öncül/olgunlaşmamış-crRNA) olgunlaşması

Ekspresyon basamağının ilk aşamasında spacer-repeat-spacer dizisinin crRNA'lara (pre-crRNA) transkripsiyonu gerçekleşir. Pre-crRNA transkripsiyonu lider sekansı içerisinde bulunan Pcrispr promotörü ile yönlendirilir. Daha sonra işlenerek olgunlaştırılan crRNA'lar crRNA-efektör kompleksine katılır. Kaskat kompleksi proteinlerini kodlayan genlerin (CasABCDE) transkripsiyonu ise, cas genleri upstream bölgesinde yer alan ve polisistronik transkript (Kaskat: Cse1, Cse2, Cas7, Cas5 ve Cas6e) oluşturan Pcas promotörü tarafından yönlendirilir. Ayrıca, CRISPR/Cas promotörlerinin susturulmasında H-NS DNA bağlama proteininin yer aldığı gösterilmiştir [2]. Tip 2 CRISPR/Cas sisteminde pre-crRNA, tracrRNA yardımıyla işlenir ve içerdiği sekans pre-crRNA'ya komplementerdir. Cas9, tanıma (REC) lobu sayesinde crRNA: tracrRNA kompleksini tanıyarak bağlanır. Bu aşamada RNaz III bu kompleksi tekrar-antitekrar bölgesinden keserek bireysel crRNA-tracrRNA birimlerine dönüştürür [3]. Cas9, crRNA: tracrRNA kompleksine bağlı kalarak Tip 2 crRNA efektör kompleksi oluşturur (Şekil 2).

CRISPR İnterferansı:

CRISPR interferansı çok basamaklı bir işlemdir. crRNA'nın Cas proteinleri ile bir denetleme kompleksi oluşturup onu istilacı nükleik asitlerdeki PAM ve protospacer çekirdek sekansına yönlendirmesiyle başlar. Protospacer genelde bir dsDNA iken, Tip 3-B sisteminde ssRNA'dır. Tip 2 ve Tip 3-B sisteminde hedef sekansın kesilmesi Cas/crRNA ribonükleoprotein kompleksi aracılığıdır, buna karşın Tip 1 ve Tip 3-A sistemi Cas nükleaza ihtiyaç vardır. Tip 1 sisteminde denetleme kompleksi dsDNA'ya bağlanır ve kesim gerçekleşir. Tip 2 sisteminde, Cas9/crRNA/tracr RNA kompleksi hedefe bağlanır ve kesim gerçekleşir. Tip 3-A sisteminde, Csm/crRNA kompleksi ve Csm6 proteinini dsDNA'ya bağlanır ve kesim gerçekleşir. Tip 3-B sisteminde ise, Cmr/crRNA kompleksi komplementer RNA'yı keser (Şekil 2).

Tip 1 CRISPR/Cas sistemi

Tip 1 CRISPR/Cas sistemi, I-A ile I-G arasında 7 alt tipi içerir [9]. Tip 1 moleküler mekanizmasına Kaskat (CRISPR associated complex for antiviral defense cascade) kompleksi ve Histidin/Aspartat (HD) domaini içeren bir Cas3 nükleaz eşlik eder [2, 15] Cas3, Tip 1'in imza proteini ve alt tip proteini Tip1-A'da Cas8a, Tip1-B'de Cas8b, Tip 1-E'de Cas8e şeklindedir (Şekil 1a). Ancak, Tip1-D Cas10d alt tip proteinini içerir [23]. CRISPR dizisinin transkripsiyonu ile oluşan öncül crRNA'lar (pre-CRISPR RNA) tekrar-spesifik endoribonükleaz Cas3 ile kesilir ve bu reaksiyon kısa crRNA'lar oluşturur (Şekil 2). Bunlar Kaskat kompleksi

ile birleşerek hedef DNA'da (virüs ya da plazmit) yer alan komplementer protospacer'ı bulmak için kullanılır. Cas8, crRNA tarafından tanınan hedef dizinin upstream kısmında yer alan kısa dizi motifini tanıyarak (PAM). PAM sekansı olmadan komplementer crRNA'lar hedef DNA'yı bulamaz. Tip 1-C'de pre-crRNA Cas5 ile kesilir [2].

Son aşamada, Kaskat kompleksi/hedef DNA oluşumu Cas3 nükleaz aktivitesini tetikler böylece plazmit ya da bakteriyofajın hedef DNA'sında ssDNA kırığı oluşturulur ve parçalanma başlar. Hedef DNA içerisinde bir "çekirdek dizi (seed sekansı)" tanımlanmıştır ve crRNA/DNA dubleksinin 5' ucundaki ilk 8 bazın bağımsızlık için kritik olduğu gösterilmiştir. Bu sekansta meydana gelen mutasyonların bakteriyofajları, *E. coli*'nin CRISPR immünitelerinden koruduğu gösterilmiştir. Bununla beraber, çekirdek sekansının 6. nükleotidinde meydana gelecek herhangi bir mutasyonun bu immüniteyi etkilemediği gösterilmiştir [15].

Tip 2 CRISPR /Cas sistemi

İmmünite fonksiyonlarını gerçekleştirmek için Cas9 imza proteini, Csn2 (Tip 2-A'da) (Şekil 1b) veya Cas4 (Tip 2-B'de) alt tip proteinleri, spacer dizisi, PAM dizisi, hedef DNA'ya komplementer 17-20 nükleotidlik crRNA ve tracrRNA (trans-aktive edici crRNA)'dan oluşan sgRNA'ya (tek-rehber RNA) ihtiyaç duyar [23]. PAM dizisi, Cas9'un PAM-bağlama domaini tarafından tanınır ve hedef dizinin downstream bölgesinde bulunur. TracrRNA'nın iki bölgesi mevcuttur; i) Cas9 ile birleşmesine aracılık eden sekonder yapı oluşturan bölge, ii) CRISPR dizisinin tekrar dizisine komplementer olan bölge. TracrRNA ve öncül-crRNA dsRNA oluşturur ve bu kompleks RNaz III ile kesilir. Kesim ürünleri, küçük crRNA rehberleridir (guide crRNA). Cas9'da iki nükleaz domaini mevcuttur; RuvC/RNazH ve McrA/HNH. Bu domainler, istilacı DNA'sında crRNA spesifik dsDNA kırıkları oluşturur. McrA/HNH, baz eşleşmesi olan ipliği keserken, RuvC/RNazH ayrılmış olan ipliği keser ki, burada bir küt uç oluşturulur. DNA hedefinin tanınması Cas9'un PAM dizisine bağlanmasıyla başlar, sonrasında DNA ipliği PAM dizisinin hemen upstream bölgesinden açılır, r-loop oluşumu ve spacer sekansının 6-8. bazları arasına denk gelen DNA hedefi kesimi gerçekleşir [2,15].

Tip 3 CRISPR /Cas sistemi

Tip 3 CRISPR sisteminde 3-A ile 3-F arasında 6 alt tip mevcuttur [9]. Cas10 imza proteini, Csm6, Cmr, Csx10 alt tip proteinlerinden oluşur [23]. Tekrar spesifik endoribonükleaz olan Cas6, pre-crRNA'yı, pre-crRNA tekrarındaki stem loop yapısında bulunan bazdan keser. Tip 3 alt tipine göre (Tip 3-A, Tip 3-B), Cas6 kesimiyle elde edilen küçük crRNA'lar, Cas 10/Csm veya Cas 10/Cmr kompleksine transfer edilir. Daha sonra, crRNA bu kompleks içerisinde bir olgunlaşma işlemine tabi tutulur. Bu işlemde 3' ucu 6 nükleotid aralıkla kesilir. Genel olarak, Tip 3-A sistemi, 9 farklı Cas/csm geni içermektedir (Şekil 1c). Tip 3-B ise 6 farklı Cas proteininden (Cmr 1, Cas10, Cmr3, Cmr4, Cmr5 ve Cmr6) oluşmaktadır. Tip 3 sisteminde, Cas10 kompleksi endoribonükleaz ve endodeoksiribonükleaz aktivitesi

gösterir ve Cas10 palm domaini kalıp olmayan DNA kesiminden sorumludur. Şimdiye kadar hiçbir çalışmada Tip 3 sisteminin PAM dizisi ihtiyacına rastlanmamıştır [2, 15].

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ VE PROBİYOTİK BAKTERİLERDE CRISPR/Cas SİSTEMİ

LAB'ta CRISPR/Cas sisteminin bulunma oranı türden türe değişiklik göstermektedir. Örneğin; *L. reuteri* %17, *L. crispatus* %96 ve *L. delbrueckii* %93 oranında bu

sisteme sahiptir [9]. LAB'ta en çok rastlanan CRISPR/Cas tipi Tip 2'dir, daha sonra Tip 1 ve çok az da Tip 3'e rastlanmaktadır [9, 18]. Genel olarak rastlanan alt tipler ise 2-A, 2-C, 1-F ve 1-E' dir (Tablo 1) [24]. 1-E ve 1-F alt tiplerinde genler kümelmiş ve Tip 1-E' de CRISPR1 ve CRISPR2, Tip 1-F'de CRISPR3 ve CRISPR4 olacak şekilde iki tekrar dizisi ile sıkıca çevrelenmiştir. İki sistemde benzerdir ancak Tip 1-E 8 gen (*cas3*, *cse1*, *cse2*, *cas7*, *cas5*, *cas6e*, *cas1*, *cas2*), Tip 1-F 7 gen (*cas1*, *cas2*–*cas3*, *csy1*, *csy2*, *csy3*, *cas6f*) içermektedir [21, 25].

Tablo 1: Bazı laktik asit bakterilerinin CRISPR/Cas sistemi tipleri, alt tipleri, spacer sayıları ve tekrar dizileri [24]

Tür	CRISPR/Cas Sistemi Tipi- Alt tipi	Spacer Sayısı	Tekrar Dizileri (DR)	GenBank/RefSeq	Kaynak
<i>Lactobacillus sakei</i> DS4	II-A, II-C	26	GCTATTGTTTCCTCAACATTCGGTTAAGATGAAAT	CP025839.1	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Lactobacillus buchneri</i>	II-A, I-F, I-E	25	GTATTCCTCCACGTACGTAGGGGTGATCC	NC_018610.1	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Lactobacillus gasserii</i>	II-A	9	GTTTTAGATGGTTGTTAGATCAATAAGGCTTAGATC	CP021427.1	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	I-E	40	GTATTCCTCCACGCAAGTGGGGGTGATCC	NC_008054.1	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	I-E	32	GGATCACCTCCACATACGTGGAGAAAAT	NC_006814.3	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Lactobacillus casei</i>	I-C, II-A	20	GTTTTCTCCCGCACATGCGGGGTGATCC	NC_008526.1	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Streptococcus thermophilus</i>	III-A, II-C, II-A, I-E	32	GTTTTGGAACATTCCGAAACAACACAGCTCTAAAAC	CP006819.1	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Pediococcus acidilactici</i>	II-A	33	GTTTCAGAAGGATGTTAAATCAATAAGGTTAAGATC	CP015206	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	II-A	1	TGACTTCTGAATCTAACTGTTGAACGCCAC	NC_008525.1	NCBI/ CRISPRFinder

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK MÜHENDİSLİĞİNDEKİ UYGULAMALARI

Genetik rekombinasyonda kullanılan CRISPR/Cas9 sistemi iki komponentten oluşur, gRNA (rehber RNA) ve *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpyCas9). gRNA' lar, komplementer hedef DNA'ya bağlanacak özellikte dizayn edilmiştir ve kesim için 3' NGG PAM sekansı SpyCas9'a rehberlik ederek, PAM sekansının 3 baz yukarısından kesim yapmasına yardımcı olur [26]. Ancak, Cas9'un bazı bakteriler türlerine toksik olduğu görülmüştür bu nedenle alternatif olarak Cas12a (Tip 5-A), Cas9 varyantı ThermoCas9 ve ya C2c1/2/3 de kullanılmaktadır [6, 26, 27].

CRISPR interferans (CRISPRi) ve CRISPR aktivasyon (CRISPRa) ifadeleri, CRISPR ile yapılan gen susturma ve gen aktivasyonu için kullanılmaktadır [28, 29]. Çift iplik kesim aktivitesi engellenmiş dCas9 (aktif olmayan Cas9), tek-rehber RNA (single-guide RNA) sayesinde hedeflenen genomik bölgelere bağlanır, ancak kesim yapmaz. Böylece transkripsiyon susturulur ya da aktive edilir. dCas9, Cas9'u kodlayan genin katalitik rezidülerinde (D10A ve ya H840A) meydana gelen mutasyonla sağlanmaktadır [10, 12, 13].

CRISPR-Cas9 genom modifikasyon yöntemi ökaryotlar ve bazı model bakterilerde geniş oranda kullanılmasına rağmen, LAB'ta henüz çalışmalar başlangıç aşamasındadır [9,30]. Gen ekleme ve çıkarmayı etkin şekilde gerçekleştirebilecek genetik araçların azlığı, LAB'ın biyoteknolojik uygulamalarına sınırlama getirmiştir. Bu nedenle, diğer genom düzenleme araçları CRISPR/Cas sistemine entegre edilerek genom düzenlemede yeni bir tasarım oluşturulması sağlanmaktadır [6,31]. Genom düzenleme için bir bakteride endojenik CRISPR/Cas sistemi olması şart değildir. Eğer endojenik CRISPR/Cas sistemi yoksa, genetik mühendisliği ile oluşturulan ekzojenik formu (sgRNA: Cas9), genom düzenleme için gerekli olan

hedeflenen rehber RNA içeren bir plazmite eklenebilir [10] (Tablo 2). Şimdiye kadar, LAB'ta sadece tip 1 ve tip 2 sistemi endojenik CRISPR temelli gen düzenleme için kullanılmıştır. Ancak, *L. salivarius* ve *L. ruminis* tip 3 sistemine sahiptir ve LAB'ta ilk tip 3 sistemi endojenik CRISPR temelli gen düzenleme aracı oluşturulabilir.

Cas9 temelli genom düzenleme, *L. reuteri*'de ssDNA rekombinasyonu ile, *L. plantarum*'da dsDNA rekombinasyonu ve plazmid-temelli homolog rekombinasyon ile, *L. lactis*'de plazmid-temelli homolog rekombinasyon ile beraber oluşturulmuştur [6, 32]. *L. reuteri*'de, hedefe yönelik mutasyon oluşturma uygulaması yüksek etkinlik oranıyla başarılıdır (99-100%) [6, 33]. CRISPR-Cas sistemi, ssDNA rekombinasyonu uygulamasını ileriye taşıyarak, wild-type (mutasyon içermeyen) hücrelerin ölümünün gerçekleşmesini, dolayısıyla mutantların etkinliğinin artmasını sağlamıştır. Çünkü Cas9 tarafından meydana getirilen DNA kırıkları tamir edilememekte, bu da wild-type hücrelerin elemine edilmesini kolaylaştırmaktadır. Bu sayede, 1 kb'a yakın delesyon ya da bir kodon mutagenesi gerçekleştirilebilir [6]. Cas9, aynı zamanda *Streptococcus thermophilus* ve *L. lactis*'te büyük hareketli genetik elementlerin çıkarılması için de kullanılmıştır [13,33]. *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpyCas9) ise, Mn²⁺ iyonları varlığında DNA'yı rehber RNA (sgRNA) olmadan kesebilir [34].

Cas9'da bulunan RuvC ve HNH domainlerinden birisinin katalitik aktivitesi inhibe edilerek tek iplik DNA kırıklarına neden olan nikaz mutantları oluşturulabilir (nikaz Cas9n-D10ACas9) [4, 12]. *L. casei*' de bir nikaz varyantı olan CRISPR-Cas9^{D10A} ile nikaz-temelli Cas9 (nCas9) düzenlemesi oluşturulmuştur. Bu genetik araç, tek bir adımda transformasyonu sağlayarak tek-gen çıkarılması ya da eklenmesine olanak sağlayan etkin bir araç olmuştur. Geniş bir konakçı oranına sahip plazmid pLCNICK genom düzenleme için diğer *Lactobacillus* türlerine adapte edilme potansiyeline sahiptir [31].

Çalışmalarda, çoklu rehber RNAlar (gRNA) nCas9 ile rastgele olacak şekilde genoma yollanıp, hedeften hiç sapmaya neden olmadan çift iplik kesimi sağlanmıştır [9].

Prokaryotlarda, CRISPR/Cas sistemi tarafından meydana gelen çift iplik kırıklarına yönelik sağlam bir tamir sisteminin olmayışı, bu sistemin antimikrobiyal ajan olarak kullanılmasına da olanak sağlamaktadır. Diziye özgü spesifik yönlendirme sayesinde bazı bakterilere karşı ölümcül hasarlar verilebilir. Yapılan bir çalışmada, CRISPR antimikrobiallarının %99 dizi benzerliği olan iki *E. coli* türünü bile ayırabildiği görülmüştür [2]. Bazı *Lactobacillus* türlerinde de homoloji yönlendirmeli tamir sisteminin (HDR) yokluğundan dolayı, bakteriler CRISPR/Cas ile oluşturulan çift ipliklik kırıklarına duyarlıdır. Bu nedenle, faj temelli RecE/T, CRISPR-Cas9 sistemi ile birleştirilmiş ve *L. plantarum* WCFS1 ve *L. brevis* ATCC367'de etkili bir genom düzenleme aracı oluşturulmuştur. Bu yöntemle, tek gen delesyonu %50-100 arasında başarılmıştır [35].

Lactococcus lactis' de endojenik CRISPR/Cas sistemi bulunmamaktadır, ancak ekzojenik Cas9 mühendisliği başarılı bir şekilde çalışmaktadır. Bir çalışmada oluşturulan ve pLABTarget adı verilen Cas9-sgRNA ekspresyon vektörü ile, *L. lactis*'de cas9 hedef çalışmalarının gerçekleştirilmesine olanak sağlanmıştır [36]. *L. lactis* ile yapılan diğer bir çalışmada, CRISPR/Cas9 yöntemi, upp ve galK gen lokuslarında nokta mutasyonu oluşturmak için kullanılmış ve % 75'in üzerinde başarı elde edilmiştir [37].

CRISPR-Cas SİSTEMİ İLE FİLOGENİ ÇALIŞMALARI

CRISPR/Cas sistemi, son zamanlarda LAB'ta suşlar arasındaki filogeni ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmaktadır [38, 39]. Tekrar-aralık-tekrar dizleri ve Cas genleri kullanılarak CRISPR-temelli tiplendirme artık tiplendirme yöntemleri arasında potansiyel olarak görülmektedir. Özellikle endüstriyel starter kültürlerin, probiyotik bakterilerin, hayvan kommensali türlerin ve problematik patojenlerin tiplendirilmesinde kullanılması için çalışmalar mevcuttur [2, 14].

CRISPR-Cas SİSTEMİ İLE PROBİYOTİK VE ENDÜSTRİYEL ÖZELLİKLERİN GELİŞTİRİLMESİ

LAB'ın genetik mühendisliğindeki uygulamalarının yanı sıra, probiyotik özelliklerinin geliştirilmesi, endüstride ve klinikte değişik uygulamalarının oluşturulması için de yine CRISPR/Cas teknolojisi kullanılmaktadır [33]. Ekzopolisakarit (EPS) üzerine yapılan bir çalışmada, tek nükleotid mutasyonu gerçekleştirmek için, endojenik CRISPR/Cas yöntemi, hedefe yönelik rehber RNA ve mutasyonu taşıyan donör kalıp sekansı içeren bir plazmid ile birleştirilmiş ve farklı bir EPS oluşturulmuştur. EPS üzerine bu tarz değişiklikler, fermente ürünün reolojik ve organoleptik karakterini değiştirmektedir [10]. *L. gasseri*'de bshA promotör sekansının düzenlenmesiyle bshA transkripsiyonu artmış, böylece

bakterinin safra tuzlarını parçalama yeteneği artırılmıştır [10]. *Bifidobacterium longum subsp. longum* bakterisine bir karbohidrat hidrolaz eklenmesiyle bakterinin galakto-oligosakarit katabolizmasına olanak sağlanmıştır [40]. *Clostridium tyrobutyricum*' da bulunan Tip 1-B sistemi, çoklu genom düzenleme amacıyla bir platform görevi görerek, cat1 geninin alkol dehidrogenaz genleriyle yer değiştirmesi neticesinde (adhE1 ve adhE2) kesikli fermantasyonda n-bütanol üretimi başarılı bir şekilde artırılmıştır [12].

L. rhamnosus suşlarının mukozaya bağlanma yeteneklerinin karşılaştırdığı genomik analiz çalışmalarına göre, spaCBA gen kümesi adezyon faktörü olarak tanımlanmıştır. spaCBA'nın adezyonda görev almadığını doğrulamak amacıyla, CRISPR-Cas yöntemi spaC'yi çıkaracak şekilde dizayn edilebilir ve adezyon fenotipi azaltılabilir [12].

LAB'ta son zamanlarda tanımlanmış olan ve konak-mikrop etkileşiminde, bağırsak enflamasyonunun düzenlenmesinde önemli yeri olan yüzey tabaka proteinleri de gelecekte CRISPR/Cas genom mühendisliği için bir hedef olacaktır. Dolayısıyla, gelecekte "CRISPRbiyotik" olarak tanımlanan ve probiyotik özellikleri geliştirilmiş yeni nesil bakterilerin oluşturulması söz konusudur [9].

CRISPR-Cas SİSTEMİ İLE AŞI ÇALIŞMALARI

Gelecek yıllarda, Cas 9 nükleaz, sgRNA ve donör DNA içeren Cas9 plazmidi (pCas9) yardımıyla, mukozal aşı uygulamalarının geliştirilmesi ve ağızdan aşı uygulamasında probiyotiklerin kullanılması düşünülmektedir. Yöntem, laktik asit bakterinde biyoterapötiklerin taşınması ve probiyotik bakterilerde aşı amaçlı antijen ekspresyonu için başarılı bir şekilde denenmiştir [10,20]. Yine benzer bir çalışmada, ağız yoluyla aşı uygulaması için probiyotik ve ökaryotik bir maya olan *Saccharomyces boulardii*'nin rekombinant formu oluşturulmuştur. Mayada ovalbumin üretecek şekilde bir gen değişimi yapılmıştır. Bu proteinin bağırsak bariyerinden kolay geçebilmesi için C-terminal ucuna *Clostridium perfringens* enterotoksininden claudin-hedefleme dizisi eklenerek (CPE), OVA-CPE (Ovalbumin- C-CPE) füzyon proteini oluşturulmuştur. Yine *ura3* oksotrof mutanı maya oluşturmak için CRISPR/Cas9 sistemi ile gen delesyonu yapılmış ve oluşturulan füzyon protein geni bu rekombinant mayaya aktarılmıştır. Fare denemeleri sonucunda, serumda IgG ve IgA seviyesinin kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir [41].

CRISPR-Cas SİSTEMİ İLE FAJLARA DİRENÇLİ STARTER KÜLTÜR SUŞ GELİŞTİRİLMESİ

Firmicutes filumu içindeki LAB'ların bazıları starter kültür ya da probiyotik olarak kullanılmaktadır [5]. Dolayısıyla, bu mikroorganizma grupları fermente gıdalar ve gastrointestinal sistem gibi ortamlarda fajlara veya yabancı DNA'ya maruz kalmaktadırlar [42]. Özellikle, peynir yapım süreçlerinde bakteriyofajların laktik asit bakterilerine saldırarak verimi düşürdüğü bilinmektedir

[43]. Bu nedenle, genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak faj-dirençli starter kültürler oluşturulmaktadır [42, 43]. Ancak, gelecekte biyoinformatik araçlar ile spacer (aralık) dizileri analiz edilebilir, suşlara özgü fajlar taranabilir endüstride veya klinikte fajlara daha dayanıklı starter kültürlerin ya da probiyotik bakterilerin elde edilmesinde genetik mühendisliği yöntemleriyle beraber kullanılabilir [9]. Genetik modifiye LAB, aynı zamanda gıda ürünlerinin tekstür ve tat profillerini geliştirmek amacıyla da kullanılabilir [9].

GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ LAB'LARIN GÜVENLİĞİ

Gıdalara katılan herhangi bir madde sağlık açısından sorun teşkil etmiyorsa "generally recognised as safe" (GRAS, genellikle güvenli olarak kabul edilen) olarak

tanımlanır ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) bu onaydan sorumludur [27]. Genetiği değiştirilmiş LAB suşları, daha stabil, daha verimli ve yüksek canlılık oranına sahip olabilmese rağmen, şüna kadar sadece genetiği değiştirilmemiş LAB'lar FDA onayına sahiptir [27]. LAB'ların töröpötik protein üretmesi ve aşu olarak kullanılabilmesi bu bakterilerin potansiyellerini güçlendirmektedir. Ancak, ne kadar efektif olurlarsa olsunlar, insanların genetik modifiye mikroorganizmaları kabul etme oranı düşüktür [27]. CRISPR-Cas9 genetik müdahale metodu USA'da belli bir seviyede kabul görmesine rağmen, Avrupa'da henüz diğer genetik modifikasyon metotlarından ayırımı yapılmamıştır. Avrupa Birliği'nde şuan kabul gören genom modifikasyon yöntemleri doğal metotlar (konjugasyon, faj transdüksiyonu veya doğal kompetans) ve rastgele mutagenез çalışmalarındır [27].

Tablo 2. LAB' ta CRISPR/Cas yöntemi ile yapılan uygulama örnekleri

Mikroorganizma	Uygulama	CRISPR-Cas yöntemi	Referans
<i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i>	Filogeni çalışmaları	CRISPR/Cas lokus ve arrayi	[33, 38]
<i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i>	Karbohidrat metabolizmasının artırılması	Endojenik CRISPR/Cas (I-E)	[10]
<i>Lactobacillus gasseri</i>	bshA transkripsiyonu artırma ve safra tuzlarının parçalanması	Endojenik CRISPR/Cas9 (II-C)	[10]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	EPS üretiminin artırılması	Endojenik CRISPR/Cas9 (II-A)	[10]
<i>Lactobacillus casei</i>	Delesyonlar ve gen insersiyonları oluşturmak	Ekzojenik- SpyCas9 ^{D10A}	[31]
<i>Lactobacillus crispatus</i>	Plazmid temelli yeniden programlanmış tip 1-E sistemi ile insersiyon, delesyon ve tek baz değişimlerinin sağlanması	Endojenik Cascade-Cas3	[20]
<i>Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis</i>	RecE/T yardımcı CRISPR-Cas9 ile tek gen delesyonları ya da kromozomal gen değişimleri	Ekzojenik- spyCas9	[35]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Cas9 yardımcı dsDNA ve ssDNA rekombinasyonu ile gen susturma, insersiyon ve nokta mutasyonları. Bu yöntemle N-asetilglukozamin üretimi (GlcNAc)	Ekzojenik- spyCas9	[44]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Cas9 düzenleme aracı ile birleştirilmiş ssDNA rekombinasyonu ile yüksek etkinlikte rekombinant seçimine olanak sağlanır	Ekzojenik- spyCas9	[9, 32]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	8 kb-102 kb arasındaki genomik ada delesyonları için tip2-A sistemi yeniden düzenlenmiştir	Endojenik sth3Cas9	[45]
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	pLABTarget	Ekzojenik- spyCas9	[35]
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	n-bütanol üretimi	Endojenik tip 1-B sistemi	[12]
<i>Lactobacillus rhamonosus</i>	spaCBA adezyon özelliğinin araştırılması	CRISPR/Cas9	[12]
<i>Lactococcus lactis</i>	Nokta mutasyonu, upp ve galK genleri	CRISPR/Cas9	[37]
Probiyotik bakteriler	Mukoza ya da ağızdan aşu	sgRNA ve donör DNA içeren Cas9 plazmidi	[10, 20]

SONUÇ

CRISPR/Cas sisteminin geliştirilmesi her alanda yeni denemelere ve uygulamalara olanak sağlamaktadır. Bu sistemlerin, LAB ile oluşturulacak biyoteknoloji ve genetik mühendisliği alanındaki uygulamalarda yerini alabilmesi için pek çok çalışma yapılmaktadır. LAB'ta CRISPR/Cas sisteminin kullanımı, endüstride ürün özelliğinin artırılmasının yanı sıra "farklı bir kullanım için yeniden tasarlama" şeklinde de olmaktadır. Ancak, CRISPR/Cas sistemi ile yeni nesil ve yeni özelliklere sahip endüstriyel suşlar geliştirilirken, hala Cas9 özgülüğündeki eksiklik nedeniyle hedeflenen genomik bölgenin haricinde, istenmeyen hedef dışı DNA bölgelerinin kesime uğraması ve etik problemler, her alanda olduğu gibi bu alanda da sistemin kısıtlayıcılığını oluşturabilmektedir. Yine de çalışmalar arttıkça bu problemler de çözüme ulaşacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Nethery, M.A., Henriksen, E.D., Daughtry, K.V., Johanningsmeier, S.D., Barrangou, R. (2019).

- Comparative genomics of eight *Lactobacillus buchneri* strains isolated from food spoilage. *BMC Genomics*, 20, 1–12.
- [2] Stout, E., Klaenhammer, T., Barrangou, R. (2017). CRISPR-Cas technologies and applications in food bacteria. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 413–437.
- [3] Sanozky-Dawes, R., Selle, K., O'Flaherty, S., Klaenhammer, T., Barrangou, R. (2015). Occurrence and activity of a type II CRISPR-Cas system in *Lactobacillus gasseri*. *Microbiology (United Kingdom)*, 161, 1752–1761.
- [4] Gümüş, N., Tezcanlı Kaymaz, B. (2018). CRISPR/Cas9 Age in Genome Editing and Leukemia Applications. *Kafkas Journal of Medical Sciences*, 8, 232–248.
- [5] Horvath, P., Coüté-Monvoisin, A.C., Romero, D.A., Boyaval, P., Fremaux, C., Barrangou, R. (2009). Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 62–70.
- [6] Börner, R.A., Kandasamy, V., Axelsen, A.M., Nielsen, A.T., Bosma, E.F. (2019). Genome editing

- of lactic acid bacteria: Opportunities for food, feed, pharma and biotech. *FEMS Microbiology Letters*, 366, 1–12.
- [7] Yörük, G.N., Güner, A. (2010). Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve *Weissella* türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6, 163–176.
- [8] Yao, R., Liu, D., Jia, X., Zheng, Y., Liu, W., Xiao, Y. (2018). CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3, 135–149.
- [9] Roberts, A., Barrangou, R. (2020). Applications of CRISPR-Cas systems in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1–15.
- [10] Hidalgo-Cantabrana, C., O'Flaherty, S., Barrangou, R. (2017). CRISPR-Based engineering of next-generation lactic acid bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 79–87.
- [11] Pijkeren, J.P., Van, Barrangou, R. (2018). Genome editing of food-grade lactobacilli to develop therapeutic probiotics. *Bugs as Drugs*, 5, 389–408.
- [12] Pan, M., Barrangou, R. (2020). Combining omics technologies with CRISPR-based genome editing to study food microbes. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 198–208.
- [13] Hao, M., Cui, Y., Qu, X. (2018). Analysis of CRISPR-cas system in *Streptococcus thermophilus* and its application. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–7.
- [14] Barrangou, R., Dudley, E.G. (2016). CRISPR-Based typing and next-generation tracking technologies. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 395–411.
- [15] Golubov, A. (2016). Chapter6: CRISPR: Bacteria Immune System. In *Genome Stability: From Virus to Human Application*. Elsevier Inc. 87-96
- [16] Alkhnbashi, O.S., Meier, T., Mitrofanov, A., Backofen, R., Voß, B. (2020). CRISPR-Cas bioinformatics. In *Methods*, 172, 3-11.
- [17] Barrangou, R., Marraffini, L.A. (2014). CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. In *Molecular Cell*, 54, 234-244.
- [18] Crawley, A.B., Henriksen, E.D., Stout, E., Brandt, K., Barrangou, R. (2018). Characterizing the activity of abundant, diverse and active CRISPR-Cas systems in lactobacilli. *Scientific Reports*, 8, 1-12.
- [19] Common, J., Morley, D., Westra, E.R., Van Houte, S. (2019). CRISPR-Cas immunity leads to a coevolutionary arms race between *Streptococcus thermophilus* and lytic phage. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374, 1-11.
- [20] Hidalgo-Cantabrana, C., Goh, Y.J., Pan, M., Sanozky-Dawes, R., Barrangou, R. (2019). Genome editing using the endogenous type I CRISPR-Cas system in *Lactobacillus crispatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 15774–15783.
- [21] McGinn, J., Marraffini, L.A. (2019). Molecular mechanisms of CRISPR–Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 7–12.
- [22] Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., Van Der Oost, J., Koonin, E.V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 467–477.
- [23] Nethery, M.A., Barrangou, R. (2019). Predicting and visualizing features of CRISPR–Cas systems. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 616). Elsevier Inc.
- [24] Grissa, I., Vergnaud, G., Pourcel, C. (2007). CRISPRFinder: A web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Research*, 35, 52–57.
- [25] Aydin, S., Personne, Y., Newire, E., Laverick, R., Russell, O., Roberts, A.P., Enne, V.I. (2017). Presence of Type I-F CRISPR/Cas systems is associated with antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72, 2213–2218.
- [26] Leenay, R.T., Vento, J.M., Shah, M., Martino, M.E., Leulier, F., Beisel, C.L. (2019). Genome editing with CRISPR-Cas9 in *Lactobacillus plantarum* revealed that editing outcomes can vary across strains and between methods. *Biotechnology Journal*, 14, 1–11.
- [27] Plavec, T.V., Berlec, A. (2020). Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, 8, 297.
- [28] Peters, J.M., Koo, B.M., Patino, R., Heussler, G.E., Hearne, C.C., Qu, J., Inclan, Y.F., Hawkins, J.S., Lu, C.H.S., Silvis, M.R., Harden, M.M., Osadnik, H., Peters, J.E., Engel, J.N., Dutton, R.J., Grossman, A.D., Gross, C.A., Rosenberg, O.S. (2019). Enabling genetic analysis of diverse bacteria with Mobile-CRISPRi. *Nature Microbiology*, 4, 244–250.
- [29] Xiong, Z.Q., Wei, Y.Y., Kong, L.H., Song, X., Yi, H.X., Ai, L.Z. (2020). Short communication: An inducible CRISPR/dCas9 gene repression system in *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*, 103, 161–165.
- [30] Muysson, J., Miller, L., Allie, R., Inglis, D.L. (2019). *The Use of CRISPR-Cas9 Genome Editing to Determine the Importance of Glycerol Uptake in Wine Yeast During Icewine Fermentation*. *Fermentation*, 5, 1-15.
- [31] Song, X., Huang, H., Xiong, Z., Ai, L., Yang, S. (2017). *CRISPR-Cas9D10A Nickase-Assisted Genome Editing in Lactobacillus casei*. 83, 1–14.
- [32] Oh, J.H., Van Pijkeren, J.P. (2014). CRISPR-Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*. *Nucleic Acids Research*, 42, 1–11.
- [33] Stout, E.A., Sanozky-Dawes, R., Goh, Y.J., Crawley, A.B., Klaenhammer, T.R., Barrangou, R. (2018). Deletion-based escape of CRISPR-CAS9 targeting in *Lactobacillus gasserii*. *Microbiology (United Kingdom)*, 164, 1098–1111.
- [34] Sundaresan, R., Keilbarth, M.W., Rajan, R., Sundaresan, R., Parameshwaran, H.P., Yogesha, S.D., Keilbarth, M.W., Rajan, R. (2017). RNA-Independent DNA cleavage activities of Cas9 and Cas12a. *CellReports*, 21, 3728–3739.
- [35] Huang, H., Song, X., Yang, S. (2019). Development of a RecE/T-Assisted CRISPR–Cas9

- Toolbox for *Lactobacillus*. *Biotechnology Journal*, 14, 1–12.
- [36] Els, S. Van Der, James, J.K., Kleerebezem, M., Bron, P.A. (2018). *Versatile Cas9-Driven Subpopulation Selection Toolbox for Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(8):e02752-17 84.
- [37] Guo, T., Xin, Y., Zhang, Y., Gu, X., Kong, J. (2019). A rapid and versatile tool for genomic engineering in *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories*, 18, 1–12.
- [38] Briner, A.E., Lugli, G.A., Milani, C., Duranti, S., Turrone, F., Gueimonde, M., Margolles, A., Van Sinderen, D., Ventura, M., Barrangou, R. (2015). Occurrence and diversity of CRISPR-Cas systems in the genus *bifidobacterium*. *PLoS ONE*, 10, 1–16.
- [39] Pan, M., Nethery, M.A., Hidalgo-Cantabrana, C., Barrangou, R. (2020). Comprehensive Mining and Characterization of CRISPR-Cas Systems in *Bifidobacterium*. *Microorganisms*, 8, 720.
- [40] Hidalgo-Cantabrana, C., Crawley, A. B., Sanchez, B., Barrangou, R. (2017). Characterization and exploitation of CRISPR loci in *Bifidobacterium longum*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–16.
- [41] Bagherpour, G., Ghasemi, H., Zand, B., Zarei, N., Roohvand, F., Ardakani, E.M., Azizi, M., Khalaj, V. (2018). Oral administration of recombinant *Saccharomyces boulardii* expressing ovalbumin-CPE fusion protein induces antibody response in mice. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–9.
- [42] Klaenhammer, T.R. (1991). Development of bacteriophage-resistant strains of lactic acid bacteria. *Biochemical Society Transactions*, 19, 675–681.
- [43] Spus, M., Li, M., Alexeeva, S., Wolkers-Rooijackers, J.C.M., Zwietering, M.H., Abee, T., Smid, E.J. (2015). Strain diversity and phage resistance in complex dairy starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 98, 5173–5182.
- [44] Zhou, D., Jiang, Z., Pang, Q., Zhu, Y., Wang, Q., Qi, Q. (2019). CRISPR/Cas9-assisted seamless genome editing in *Lactobacillus plantarum* and its application in N-acetylglucosamine production. *Applied and Environmental Microbiology*, 85, 1–11.
- [45] Selle, K., Klaenhammer, T.R., Barrangou, R. (2015). *CRISPR-based screening of genomic island excision events in bacteria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 112, 1–6.
-
-